

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Natália Kronbauer de Oliveira

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A CRIPTOCOCOSE**

Porto Alegre

2016

Natália Kronbauer de Oliveira

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A CRIPTOCOCOSE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a Livia Kmetzsch Rosa e Silva
Co-orientadora: Eamim Daidrê Squizani

Porto Alegre

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Natália Kronbauer
Estratégias biotecnológicas para o
reposicionamento de fármacos como alternativa
terapêutica para a criptococose / Natália Kronbauer
de Oliveira. -- 2016.
58 f.

Orientadora: Livia Kmetzsch.
Coorientadora: Eamim Daidrê Squizani.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Biologia Molecular. 2. Cryptococcus
neoformans. 3. Amiodarona. 4. Cálcio. 5. Sinergismo.
I. Kmetzsch, Livia, orient. II. Squizani, Eamim
Daidrê, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Natália Kronbauer de Oliveira

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O REPOSICIONAMENTO DE
FÁRMACOS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA A CRIPTOCOCOSE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Luciane Maria Pereira Passaglia - UFRGS

Vanessa de Abreu Barcellos - UFRGS

Lívia Kmetzsch Rosa e Silva - UFRGS

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma das leveduras responsáveis pelo desenvolvimento da meningite criptocócica, importante infecção oportunística em imunocomprometidos, a qual corresponde à terceira complicação neurológica mais comum em portadores do vírus HIV. O tratamento padrão com anfotericina B e fluconazol é efetivo em 50% a 80% dos casos, sendo a sua toxicidade e o desenvolvimento de resistência problemas recorrentes. Assim, destaca-se a necessidade pela busca de novos alvos e fármacos para o tratamento da meningite criptocócica. A reposição de fármacos já utilizados na clínica, que demonstram atividade antifúngica, como a amiodarona e outros bloqueadores de canais de cálcio, mostram-se promissores. Considerando a importância do armazenamento intracelular de cálcio mediado por transportadores deste metal na virulência de *C. neoformans*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de fármacos com mecanismo de ação baseado no bloqueio de canais de cálcio como alternativa terapêutica para a criptococose. Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) foram determinados pelo método de microdiluição utilizando linhagens mutantes nulas para os transportadores de cálcio Pmc1 e Vcx1. As linhagens selvagem H99 e complementada *pmc1::PMC1* apresentaram MIC para amiodarona de 12,5 µg/mL, enquanto que os mutantes nulos *pmc1*, *vcx1* e *pmc1vcx1* apresentaram uma maior sensibilidade, tendo MICs de 6,25 µg/mL. O sinergismo entre a amiodarona e o fluconazol foi avaliado pelo método *checkerboard*, no qual todas as linhagens obtiveram um índice FIC que indica sinergismo entre os fármacos. Os fármacos verapamil e diltiazem não demonstraram efeito antifúngico, não sendo possível encontrar efeito sinérgico com o fluconazol. Dois importantes fatores de virulência de *C. neoformans*, a formação da cápsula polissacarídica e a produção de melanina foram avaliados em meio mínimo e meio com asparagina suplementado com L-DOPA, respectivamente. Esses fatores não foram afetados pela adição de amiodarona ao meio, apenas houve um pequeno aumento na formação da cápsula polissacarídica na linhagem complementada *pmc1::PMC1*. Os níveis de cálcio intracelular, determinados pelo marcador Fura-2 AM, não foram afetados pela adição de amiodarona. A expressão relativa de importantes genes na via mediada por Ca^{2+} -calcineurina foram avaliados por RT-qPCR. *CRZ1* e *ECA1* apresentaram expressão diminuída na presença de amiodarona na linhagem mutante *pmc1*. Esses dados reforçam a possibilidade de fármacos bloqueadores de canais de cálcio serem utilizados na clínica combinados com fluconazol, estimulando novas possibilidades de tratamento para a meningite criptocócica.

Palavras-chave: *Cryptococcus neoformans*, amiodarona, cálcio, fluconazol, MIC, sinergismo

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is one of the yeasts responsible for cryptococcal meningoencephalitis, an important opportunistic infection in immunocompromised individuals that corresponds to the third most common neurological complication in AIDS patients. The recommended treatment with amphotericin B and fluconazole is 50% to 80% effective, with toxicity and resistance as recurrent problems. This indicates the importance of searching for new targets and drugs for the treatment of meningoencephalitis. Re-purposing drugs already used in the clinic that demonstrate antifungal activity have proved promising, such as amiodarone and other calcium channel blockers. Considering the importance of calcium storage mediated by calcium transporters on the cryptococcal virulence, the aim of this study was to evaluate the use of calcium channel blockers drugs as an alternative therapy for cryptococcosis. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by broth microdilution test using null mutant strains for calcium transporters *Pmc1* and *Vcx1*. The wild-type H99 and complemented *pmc1::PMC1* strains presented MIC for amiodarone of 12,5 µg/mL, while the mutant strains *pmc1*, *vcx1* and *pmc1vcx1* showed more sensitivity, with a MIC of 6,25 µg/mL. The synergy between amiodarone and fluconazole was evaluated by the checkerboard method in which all the strains had a FIC index that indicates synergy between the drugs. The drugs verapamil e diltiazem did not showed antifungal activity nor demonstrated synergy with fluconazole. Two important *C. neoformans* virulence factors, capsule formation and melanin production, were evaluated in minimal medium and asparagine medium supplemented with L-DOPA, respectively. These factors were not affected by addition of amiodarone in the medium, showing only a slight increase in capsule formation in complemented strain *pmc1::PMC1*. The levels of intracellular calcium were determined by the dye Fura-2 AM. No significant differences were found after amiodarone addition. The relative expression of important genes in the calcium-calcineurin signaling pathway were evaluated by RT-qPCR. *CRZ1* and *ECA1* showed decreased expression in the mutant strain *pmc1* caused by amiodarone presence. These data support the possibility of calcium channel blockers being used in combination with fluconazol, stimulating new possibilities for treating meningoencephalitis.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, amiodarone, calcium, fluconazole, MIC, synergy

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1	JUSTIFICATIVA.....	15
1.2	OBJETIVOS	16
1.2.1	Objetivo geral.....	16
1.2.2	Objetivos específicos	16
2	ARTIGO CIENTÍFICO	17
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BMC	
	MICROBIOLOGY	47

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada pertencente ao filo Basidiomycota, cuja infecção oportunística de um hospedeiro humano é responsável pelo desenvolvimento da meningite criptocócica. A rota de infecção humana se dá por meio da inalação de células dessecadas ou esporos provenientes do meio ambiente, principalmente de fezes de pombos. Uma vez nos espaços alveolares, as células de *Cryptococcus* podem sobreviver extracelularmente e/ou transportarem-se para dentro do tecido pulmonar quer pela internalização por células epiteliais ou por macrófagos alveolares. Nesta fase, dependendo da resposta imune do hospedeiro, ocorre a colonização do pulmão, na qual *Cryptococcus* é removido ou promove uma infecção latente assintomática. Em indivíduos imunocomprometidos, no entanto, a colonização poderá causar infecção sintomática, caracterizada por nódulos e inflamação pulmonar, com subsequente disseminação para outros tecidos e órgãos. (Sabiiti e May, 2012; Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014; Tseng *et al.*, 2015)

Para a meningite criptocócica se estabelecer, no entanto, é necessário que o fungo atravesse a barreira hematoencefálica, cuja função é assegurar que o cérebro esteja altamente protegido, prevenindo a passagem da maior parte das moléculas. Essa transmigração pode se dar por meio do mecanismo chamado Cavalo de Troia, no qual as células de *Cryptococcus* parasitam monócitos e/ou macrófagos, sendo transportados através da barreira. O fungo pode também ligar-se e ser endocitado por células endoteliais microvasculares, resultando em transcitose através da barreira hematoencefálica. Por fim, o patógeno pode danificar e enfraquecer as junções celulares (*tight junctions*) a fim de obter passagem através dos espaços intercelulares. Uma vez que a infecção esteja estabelecida, os sintomas mais comuns são cefaleia, febre, indisposição e estado mental alterado, sendo pressão intracraniana elevada a principal complicação. (Sabiiti e May, 2012; Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014)

Moléculas antimicrobianas do hospedeiro são responsáveis por eliminar patógenos tanto extracelulares quanto internalizados. Contudo, *C. neoformans* desenvolveu mecanismos para evadir agentes antimicrobianos e manipular a resposta imune de modo a promover sua sobrevivência no hospedeiro. A expressão da cápsula polissacarídica está envolvida na resistência a fagocitose e modulação imune. Por ser antifagocítica, linhagens altamente encapsuladas demonstram ser menos fagocitadas, sugerindo uma maior concentração no pulmão e uma taxa reduzida de disseminação sistêmica. Linhagens acapsulares tendem a ser

incapazes de desenvolver a doença ou severamente debilitadas na progressão da criptococose. A montagem da cápsula requer a interação com componentes da parede celular, como α - 1,3 - glucana e moléculas de quitina. Sua composição se dá principalmente por dois polissacarídeos, glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), que representam, respectivamente, 90-95% e 5-8% da massa dessa estrutura. Manoproteínas constituem menos de 1% da massa total da cápsula e pouco de sua função já foi elucidado. Para cobrir a superfície da célula, os polissacarídeos são liberados no meio extracelular por meio de vesículas de secreção. (Sabiiti e May, 2012; Vecchiarelli *et al.*, 2013; Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014)

O pigmento melanina possui propriedades antioxidantes, além de proteger contra a ação de peptídeos microbicidas e ingestão por macrófagos. Esses fatores sugerem que a melanina possa elevar a virulência ao proteger a célula de ataques do sistema imune. Ademais, há indícios de que ela tenha um papel na proteção contra antimicrobianos, tendo estudos demonstrado que células melanizadas de *C. neoformans* são menos suscetíveis a anfotericina B. A melanina é produzida pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos, cuja reação é catalisada pela enzima lacase cobre-dependente. Além disso, o neurotropismo do fungo foi correlacionado com sua habilidade de converter catecolaminas em melanina, mais especificamente epinefrina, norepinefrina e dopamina, que agem no sistema nervoso central como neurotransmissores, demonstrando a importância desse fator de virulência para o desenvolvimento da infecção. (Casadevall, Rosas e Nosanchuk, 2000; Sabiiti e May, 2012; Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014)

A produção de enzimas degradativas como fosfolipase, proteinase e urease estão ligadas ao enfraquecimento da integridade intracelular e intercelular do hospedeiro, facilitando a disseminação do patógeno no cérebro. A ação da fosfolipase pode resultar em desestabilização de membranas, lise celular e liberação de mensageiros secundários lipídicos, promovendo infecção pulmonar e disseminação de *Cryptococcus* na linfa e no sangue. Fosfolipase B (codificada pelo gene *PLB1*) cliva um dos componentes mais importantes do surfactante pulmonar, auxiliando na aderência do fungo a células epiteliais pulmonares e, assim, auxiliando na disseminação. Além disso, Plb1 aumenta a penetração do fungo através da barreira hematoencefálica por meio da ativação de Rac1. A presença de proteinase confere a habilidade de degradar proteínas do hospedeiro, incluindo colágeno, elastina, fibrinogênio e imunoglobulinas. Quando atua em combinação com a fosfolipase, possibilita a replicação de *C. neoformans* em macrófagos ao danificar membranas fagossomais e escapar da morte por

enzimas fagocíticas. A urease Ure1 é um importante fator para a invasão do sistema nervoso central. Ela tem a capacidade de converter a ureia em amônia, a qual tem efeitos prejudiciais na matriz extracelular, promovendo penetração paracelular da barreira hematoencefálica pelo *C. neoformans*. Ademais, a capacidade de crescer a temperatura corporal de 37°C e sob condições de hipóxia são fundamentais para o estabelecimento da infecção por *C. neoformans*. (Sabiiti e May, 2012; Srikanta, Santiago-Tirado e Doering, 2014; Tseng *et al.*, 2015)

C. neoformans é bem caracterizado por infectar indivíduos imunocomprometidos, como pacientes recebendo quimioterapia, pacientes de transplantes de órgãos recebendo terapia imunossupressora e, principalmente, portadores do vírus HIV. Segundo dados do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (<http://www.unaids.org/>) em 2014, 36.9 milhões de pessoas são portadoras do vírus HIV, 2 milhões são infectadas a cada ano e 1.2 milhões morreram devido a doenças relacionadas a AIDS. Condições neuropatológicas estão presentes em aproximadamente 70% a 90% de pacientes com AIDS, sendo a meningite criptocócica a terceira complicação neurológica mais frequente. (Cogliati, 2013) Em países com uma alta prevalência de HIV/AIDS, *Cryptococcus* é uma das maiores causas de meningite, mais frequente que *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*. Mundialmente, a estimativa é que ocorram 1 milhão de casos de meningite criptocócica em pessoas com HIV/AIDS, resultando em aproximadamente 625.000 mortes. A África subsaariana tem a maior prevalência, com 13-44% das mortes relacionadas ao HIV sendo causadas por criptococose. Nesta região, as mortes relacionadas à meningite criptocócica são mais frequentes que às devidas a tuberculose, aproximando-se ao número relacionado a doenças infantis (pertussis, poliomielite, difteria e tétano), doenças diarreicas e malária. (Park *et al.*, 2009)

Um estudo em duas grandes cidades dos Estados Unidos da América, Atlanta e Houston, indicou que a incidência anual de criptococose entre pessoas com HIV/AIDS foi entre 2 e 7 casos por 1.000 habitantes. A incidência geral na população foi de 0.4 a 1.3 casos por 100.000 habitantes, com a taxa de mortalidade sendo de 12%. (Mirza *et al.*, 2003) No Brasil, a criptococose foi predominante nas regiões sudoeste e sul, sendo os estados do Rio de Janeiro e São Paulo os que mais concentraram mortes em decorrência do fungo. No entanto, nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste a falta de registro das causas de morte são mais comuns que nas regiões Sul e Sudoeste, podendo haver imprecisão nos dados. A média anual de mortes aumentou de 78 (24,5%) em 1996 para 89 (26,8%) em 2006, nacionalmente. Em portadores do vírus HIV, a meningite criptocócica foi mencionada em 50,9% das declarações de morte, tornando-se a principal micose relacionada a AIDS. (Prado *et al.*, 2009) Em Porto Alegre (RS),

um estudo coletou amostras de fezes de pombos em cinco praças, sendo possível isolar *C. neoformans* em 100% das amostras avaliadas, indicando sua alta prevalência em ambientes urbanos. (Reolon, Perez e Mezzari, 2004)

O tratamento de infecções fúngicas é um desafio pois há muitas semelhanças entre a maquinaria celular dos fungos e dos humanos, portanto há um número menor de drogas disponíveis para o tratamento de fungos em comparação com doenças bacterianas ou virais. (Idnurm *et al.*, 2005) Para tratar a meningite criptocócica, é indicado a administração de anfotericina B (0,7 - 1,0 mg/kg por dia, por via intravenosa) e flucitosina (100 mg/kg por dia, por via oral, dividida em 4 doses) por, pelo menos, 2-4 semanas, seguido de fluconazol (400-800 mg/kg por dia, por via oral) por 8 semanas. Posteriormente, uma terapia de manutenção longa com fluconazol (200-400 mg/kg por dia, por via oral) é mantida por 6-12 meses. (Perfect *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 2015) A anfotericina B pertence à classe dos polienos, cujo mecanismo de ação baseia-se na ligação da porção hidrofóbica da molécula ao ergosterol da membrana celular fúngica, produzindo um agregado que forma canais transmembrana. Esse defeito causa despolarização da membrana e um aumento da permeabilidade da membrana a prótons e cátions monovalentes. O canal estabiliza-se em sua forma aberta, destruindo a atividade e permitindo o vazamento do conteúdo citoplasmático, levando a morte celular. O ergosterol é o principal esterol da membrana celular fúngica, ao contrário das membranas de mamíferos, onde predomina o colesterol. A diferença na estrutura e proporção entre esses dois esteróis é a base para a seletividade antifúngica da anfotericina B. Entretanto, essa seletividade ainda é baixa, indicando a toxicidade da anfotericina B para células mamíferas. Além da toxicidade aguda, que pode causar náusea, febre, hipertensão/hipotensão e hipóxia, a nefrotoxicidade da anfotericina B com o uso crônico limita seu tempo de aplicação. Para superar essa toxicidade foram realizadas inúmeras reformulações do agente. A combinação de lipídios com a anfotericina B, encapsulada em lisossomos ou em complexos lipídicos em forma de disco, mostrou-se a mais promissora. (Odds, Brown e Gow, 2003; Laniado-Laborín e Cabrales-Vargas, 2009)

A flucitosina (5-FC) é transportada para dentro das células fúngicas pela enzima citosina permease, onde é convertido a 5-fluorouracil (5-FU) pela enzima citosina deaminase. A partir do 5-fluorouracil, dois mecanismos de atividade antifúngica podem ser distinguidos. No primeiro, o 5-FU é convertido a 5-fluorouridina trifosfato (FUTP), que é incorporado ao RNA fúngico, inibindo a síntese proteica. No segundo, o 5-FU é convertido pela enzima uridina monofosfato pirofosforilase a 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), um potente inibidor

da enzima timidilato sintetase, a qual atua na biossíntese do DNA. Consequentemente, a síntese do DNA fúngico é inibida. Flucitosina é utilizada em terapia conjunta pela ocorrência de resistência. Os efeitos colaterais mais relacionados a utilização de flucitosina são náusea, vômitos e diarreias, com efeitos mais severos como hepatotoxicidade e depressão da medula óssea sendo citados. (Vermes, Guchelaar e Dankert, 2000; Odds, Brown e Gow, 2003) Os azólicos são a maior classe de antifúngicos em uso na clínica. Essas drogas podem ser divididas em dois grupos, os imidazóis e triazóis, na qual fluconazol está incluso. O seu principal efeito é inibir a desmetilação do grupo 14 α do lanosterol na via de biossíntese do ergosterol. Com a depleção do ergosterol, a fluidez e permeabilidade da membrana fúngica é alterada, com consequências secundárias para enzimas que ligam-se a membrana, como as envolvidas com a síntese da parede celular. Resistência aos azólicos pode ocorrer por mutações que modificam a molécula alvo ou por superexpressão de bombas de membrana que exportam o antifúngico da célula. (Odds, Brown e Gow, 2003) Um estudo realizado em Uganda identificou uma crescente resistência ao fluconazol, onde 31% dos isolados clínicos não demonstraram suscetibilidade ao fluconazol nas concentrações consideradas inibitórias. (Smith *et al.*, 2015) Ademais, fluconazol tem apenas efeito fungistático contra *C. neoformans*, inibindo o crescimento, mas não erradicando a carga fúngica. (Klepser, Wolfe e Pfaller, 1998)

As estimativas de que o tratamento é efetivo em 50% a 80% das vezes, com as drogas antifúngicas causando toxicidade em um terço dos casos, reforçam a necessidade de novos alvos e fármacos para o tratamento da meningite criptocócica. (Bratton *et al.*, 2013) Neste contexto, o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica e que apresentam uma potencial atividade antifúngica emergiram como uma possibilidade de acelerar o desenvolvimento farmacológico em geral. Inibidores da chaperona Hsp90, em desenvolvimento como agentes anticâncer, reduziram a resistência a fluconazol e demonstraram atividade antifúngica sinérgica em modelo *in vitro* de candidíase por *Candida albicans*. Além disso, a combinação desses agentes com fluconazol gerou dramática redução da viabilidade das células, convertendo o efeito fungistático do fluconazol em fungicida. Em modelo invertebrado, a combinação dos fármacos também demonstrou efeito terapêutico ao aumentar a sobrevivência da *Galleria mellonella* a infecções por *C. albicans*. (Cowen *et al.*, 2009) Sertralina, um dos antidepressivos mais usados na clínica, demonstrou uma potente ação fungicida contra *C. neoformans*. Em combinação com fluconazol indicou efeito sinérgico ou aditivo em ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de infecção sistêmica de *C. neoformans*. Entretanto, sertralina mostrou-se menos efetiva contra espécies de *Candida*, com sua combinação com fluconazol sendo geralmente

antagônica. (Zhai *et al.*, 2012) Em um teste clínico realizado na Uganda, pacientes recebendo sertralina, além do tratamento padrão, tiveram uma remoção mais rápida do fungo do líquido cefalorraquidiano e uma menor incidência de recidiva, além de boa segurança e tolerabilidade. (Rhein *et al.*, 2016) Estudos utilizando a droga antiparasitária cloroquina apresentaram efeito antifúngico ao inibir o crescimento de *C. neoformans* ou facilitar a eliminação do fungo pelos macrófagos. (Coelho e Casadevall, 2016)

Amiodarona pertence a classe III de fármacos antiarrítmicos, usada no tratamento de uma variedade de taquiarritmias. Após sua aplicação, ela relaxa o músculo liso vascular e reduz a resistência vascular periférica. Esse fármaco tem inúmeros outros efeitos, incluindo ações similares ao antiarrítmicos das classes Ia, II e IV, demonstrando ação como β -bloqueador e bloqueador de canais de cálcio. A amiodarona demonstrou ter atividade antifúngica por inibir o crescimento de diversos fungos, incluindo espécies de *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Candida* e *Fusarium*, demonstrando uma atividade fungicida. (Courchesne, 2002) Em *Saccharomyces cerevisiae* houve evidências de que a sua toxicidade é mediada por distúrbios na homeostase do cálcio. Em mutantes nulos para calcineurina e vários transportadores de cálcio, a sensibilidade a amiodarona correlaciona-se com sobrecarga de cálcio citoplasmático. Medições do cálcio citoplasmático indicaram um imediato influxo dose dependente, com ativação da via da calcineurina e acúmulo nuclear do fator de transcrição dependente de calcineurina Crz1. Em seguida haveria uma liberação do cálcio do vacúolo por meio do canal de cálcio Yvc1, independentemente da entrada de cálcio extracelular. Também foi demonstrado que amiodarona e azólicos são altamente sinérgicos em *S. cerevisiae*, exibindo potente efeito fungicida em combinação. (Gupta *et al.*, 2003; Gamarra *et al.*, 2010) Em *Candida albicans*, o perfil transcricional foi avaliado na presença de amiodarona no intuito de estabelecer os mecanismos de toxicidade. Genes envolvidos na homeostase e transporte vacuolar de cálcio foram diferencialmente expressos nesta condição, o que indica que a homeostase deste metal pode representar um alvo promissor para o desenvolvimento de novos antifúngicos. (Gamarra *et al.*, 2010) Já em *Candida tropicalis*, amiodarona administrada em combinação com fluconazol exibiu atividade antifúngica contra linhagens resistentes a fluconazol. (Da Silva *et al.*, 2013) Por fim, amiodarona foi capaz de agir em *C. neoformans* internalizados por fagócitos. (Butts *et al.*, 2013)

Fungos patogênicos utilizam sistemas de sinalização complexos para se adaptar ao ambiente, controlando proliferação, desenvolvimento e, em alguns casos, virulência. A via Ca^{2+} -calcineurina controla resposta a estresse ambiental, *mating*, frutificação monocariótica,

crecimento a 37°C e virulência em *C. neoformans*. (Kozubowski, Lee e Heitman, 2009) Íons de cálcio (Ca^{2+}) intracelulares são importantes segundo mensageiros em todos os organismos. O nível de cálcio citoplasmático é muito baixo em um estado de repouso, no entanto, em resposta a um estresse externo, há um rápido influxo de cálcio por meio do sistema de influxo de cálcio da membrana plasmática. O aumento da concentração de cálcio afeta um vasto número de processos celulares, ativando a via da calcineurina para reduzir a concentração plasmática do íon a níveis basais. A membrana plasmática fúngica contém dois tipos de sistema de influxo de cálcio, caracterizados extensivamente em *Saccharomyces cerevisiae*. O primeiro é o sistema de influxo de cálcio de alta afinidade (HACS), que consiste de duas proteínas, Cch1 e Mid1, por onde há influxo de cálcio do espaço extracelular em resposta a estímulos repentinos. O segundo é o sistema de influxo de cálcio de baixa afinidade, cujo principal componente é Fig1. O aumento da concentração intracelular de cálcio também pode dar-se por secreção de cálcio de compartimentos internos. O vacúolo, um importante compartimento em fungos, é crucial para diferenciação, adaptação ao estresse, endocitose, autofagia e patogênese. Ademais, esse compartimento é o principal local de estoque de cálcio intracelular. Yvc1 é um canal de cálcio localizado na membrana vacuolar que libera cálcio no espaço citoplasmático em resposta a um estímulo alcalino. No entanto, um aumento contínuo na concentração de cálcio intracelular é prejudicial para a célula, por conseguinte há uma retirada dos íons cálcio para organelas secretórias ou ativação de uma via restaurativa. Especificamente, a Ca^{2+} -ATPase Pmc1 e o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Vcx1, localizados na membrana vacuolar, e as bombas de cálcio Pmr1, Cod1 e Eca1, localizados no aparato de Golgi e retículo endoplasmático, são ativados para direcionar o cálcio citosólico para organelas secretórias. (Liu *et al.*, 2015)

O sensor de Ca^{2+} calmodulina detecta o aumento na concentração citoplasmática de cálcio e liga os íons a enzimas Ca^{2+} /calmodulina dependentes subsequentemente ativadas, como a calcineurina. A calcineurina ativada age em seus alvos CRZ1/TCN1 e PRZ1, induzindo sua desfosforilação e translocação do citoplasma para o núcleo, causando a expressão de diversos genes alvo como PMC1, PMR1 e PMR2. Subsequentemente, o nível de cálcio intracelular é reduzido a níveis basais pela captação de Ca^{2+} pelas organelas e pela inibição da liberação de cálcio pelo vacúolo. (Liu *et al.*, 2015)

Dados do nosso grupo de pesquisa estão relacionados à caracterização de dois transportadores vacuolares de cálcio, Pmc1 e Vcx1, de *C. neoformans*. O mutante nulo *vcx1* demonstrou ter virulência atenuada em modelo de infecção intranasal em camundongos. Ademais, o mutante *vcx1* apresentou capacidade reduzida de produzir GXM, o principal

polissacarídeo capsular de *C. neoformans*, o que poderia estar relacionado a sua reduzida taxa de fagocitose e sobrevivência após infecção do macrófago. (Kmetzsch *et al.*, 2010) Mutantes nulos *pmc1* foram sensíveis a altas concentrações de cálcio, além de demonstrarem defeitos na formação da cápsula em meio DMEM e liberação de GXM. O transportador Pmc1 confirmou sua importância para a progressão pulmonar da doença e para a colonização do cérebro, visto que os mutantes nulos apresentaram carga fúngica pulmonar diminuída e impossibilidade de colonizar os tecidos cerebrais. (Kmetzsch *et al.*, 2013)

Estas observações reforçam que a manutenção da homeostase do cálcio é fundamental para a virulência de *Cryptococcus neoformans*. Portanto, a avaliação de fármacos com mecanismo de ação semelhante a de amiodarona pode representar uma alternativa terapêutica viável para o tratamento da meningite criptocócica.

1.1 JUSTIFICATIVA

O controle de infecções fúngicas oportunistas tem emergido como um importante desafio para a saúde pública mundial. A levedura *Cryptococcus neoformans* é o agente etiológico da meningite criptocócica, infecção fúngica que acomete o sistema nervoso central, considerada a terceira complicação neurológica mais frequente em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O repertório de antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas é limitado. Neste contexto, o reposicionamento de fármacos já utilizados na clínica e que apresentam uma potencial atividade antifúngica emergiram como uma possibilidade de acelerar o desenvolvimento farmacológico em geral. A manutenção da homeostase de cálcio é fundamental para a virulência de fungos patogênicos, portanto a utilização de fármacos bloqueadores de canais de cálcio pode representar uma relevante alternativa terapêutica para a criptococose.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização de fármacos com mecanismo de ação baseado no bloqueio de canais de cálcio como alternativa terapêutica para a criptococose.

1.2.2 Objetivos específicos

- (i) Busca de fármacos com mecanismo de ação baseado no bloqueio de canais de cálcio;
- (ii) Avaliação da sensibilidade das linhagens selvagem (H99) e mutantes *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e *pmc1::PMC1* de *C. neoformans* aos fármacos de interesse associados ou não com fluconazol e determinação da concentração inibitória mínima de cada fármaco para *C. neoformans*;
- (iii) Avaliação do efeito dos fármacos de interesse na expressão dos principais fatores de virulência de *C. neoformans*;
- (iv) Determinação da concentração relativa de cálcio intracelular em células de *C. neoformans* expostas aos fármacos de interesse.
- (v) Determinação do perfil de expressão de genes de *C. neoformans* relacionados a via de sinalização mediada por cálcio e calcineurina em presença do(s) fármaco(s) selecionado(s);

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de potencial atividade antifúngica de amiodarona em *Cryptococcus neoformans*

Natália Kronbauer de Oliveira^a, Eamim Daidrê Squizani^a e Lívia Kmetzsch^{ab*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 4500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

^b Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, Avenida Bento Gonçalves 4500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

Email: Natália Kronbauer de Oliveira – nati_k_o@hotmail.com; Eamim Daidrê Squizani - eamimsquizani@gmail.com; Lívia Kmetzsch* - liviak@cbiot.ufrgs.br

* Autor correspondente

19 **Resumo**

20 Introdução: *Cryptococcus neoformans* é uma levedura responsável pelo desenvolvimento da
21 meningite criptocócica, importante infecção oportunista em imunocomprometidos. O
22 tratamento não é sempre efetivo, com toxicidade e resistência sendo problemas recorrentes,
23 indicando a importância de novos tratamentos. A reposição de fármacos já utilizados na clínica,
24 com potencial atividade antifúngica, como a amiodarona e outros bloqueadores de canais de
25 cálcio, mostram-se promissores.

26 Resultados: A amiodarona demonstrou ter atividade antifúngica contra linhagens de *C.*
27 *neoformans* e um efeito sinérgico ao ser combinado com fluconazol. No entanto, esse fármaco
28 não alterou os principais fatores de virulência do fungo, a formação de cápsula polissacarídica
29 e a produção de melanina. Além disto, o fármaco amiodarona não causou uma alteração dos
30 níveis de cálcio intracelular nas concentrações testadas. Foi observada uma diminuição da
31 expressão relativa de importantes genes na via mediada por Ca^{2+} -calcineurina, *CRZI* e *ECA1*,
32 na presença de amiodarona na linhagem mutante para o transportador de cálcio Pmc1. Os
33 demais fármacos bloqueadores de canais de cálcio, verapamil e diltiazem, demonstraram um
34 efeito antifúngico menor e não apresentaram sinergismo com fluconazol.

35 Conclusões: Esses resultados reforçam o potencial de fármacos bloqueadores de canais de
36 cálcio como tratamento para infecções fúngicas. Seu efeito sinérgico com fluconazol fortalece
37 a possibilidade dessa classe de fármacos ser testada na clínica, abrindo possibilidades para
38 novos tratamentos para a meningite criptocócica.

39 **Palavras-chave:** *Cryptococcus neoformans*, amiodarona, cálcio, fluconazol, MIC, sinergismo

40

41

42 **Introdução**

43 *Cryptococcus neoformans* é um importante patógeno oportunístico, cuja infecção de um
44 hospedeiro imunocomprometido é responsável pelo desenvolvimento da meningite
45 criptocócica. Esta enfermidade é a terceira mais frequente complicação neurológica em
46 portadores do vírus HIV, com uma estimativa de 1 milhão de novos casos por ano. [1,2] O
47 tratamento de infecções fúngicas continua sendo um desafio, pois a maquinaria celular dos
48 fungos e dos humanos é muito semelhante. [3] Para o tratamento da meningite criptocócica é
49 indicado a administração de anfotericina B e flucitosina por 2-4 semanas, seguido de uma
50 terapia de manutenção longa com fluconazol por 6-12 meses. [4] Entretanto, a anfotericina B
51 demonstra nefrotoxicidade severa, o que limita seu tempo de utilização. [5] A flucitosina e o
52 fluconazol foram relacionados com a ocorrência de resistência, sendo que 31% dos isolados
53 clínicos de um hospital na Uganda não demonstraram sensibilidade ao fluconazol nas
54 concentrações consideradas inibitórias. [6, 7]

55 As estimativas de que o tratamento é efetivo em 50% a 80% das vezes, com as drogas
56 antifúngicas causando toxicidade em um terço dos casos, reforçam a necessidade de novos alvos
57 e fármacos para o tratamento da meningite criptocócica. [8] Neste contexto, o reposicionamento
58 de fármacos já utilizados na clínica e que apresentam uma potencial atividade antifúngica
59 emergiram como uma possibilidade de acelerar o desenvolvimento farmacológico em geral.
60 Testes realizados com o antidepressivo sertralina demonstraram potente efeito fungicida do
61 fármaco, indicando também efeito sinérgico ou aditivo em combinação com fluconazol. [9] O
62 fármaco antiarrítmico amiodarona apresentou efeito fungicida contra diversas espécies de
63 fungos, incluindo *C. neoformans*. Em *Saccharomyces cerevisiae* houve evidências de que a sua
64 toxicidade é mediada por distúrbios na homeostase do cálcio. Determinações do cálcio
65 citoplasmático indicaram um imediato influxo dose dependente, com ativação da via da
66 calcineurina e acúmulo nuclear do fator de transcrição dependente de calcineurina Crz1. Em

67 *Candida albicans*, genes envolvidos na homeostase e transporte vacuolar de cálcio foram
68 diferencialmente expressos na presença de amiodarona, o que indica que a homeostase deste
69 metal pode representar um alvo promissor para o desenvolvimento de novos antifúngicos.
70 Ademais, ambas as espécies de levedura demonstraram efeito sinérgico entre amiodarona e
71 fluconazol. [10, 11]

72 A via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina é fundamental para *C. neoformans*,
73 pois controla virulência, *mating*, crescimento a 37°C, frutificação monocariótica e resposta a
74 estresse ambiental. [12 – 14] O cálcio entra na célula por um sistema de alta afinidade,
75 extensivamente caracterizado em *S. cerevisiae*, formado pelas proteínas Cch1 e Mid1 em
76 resposta a estímulos repentinos. [15] Yvc1 é um canal de cálcio localizado na membrana
77 vacuolar que também libera cálcio no espaço citoplasmático, em resposta a um estímulo
78 alcalino. [16] No entanto, um aumento contínuo na concentração de cálcio intracelular é tóxico
79 para a célula, portanto há a ativação de canais para direcionar o cálcio intracelular para
80 organelas secretórias. Entre elas estão a Ca^{2+} -ATPase Pmc1 e o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Vcx1,
81 localizados na membrana vacuolar, e as bombas de cálcio Pmr1, Cod1 e Eca1, localizados no
82 aparato de Golgi e retículo endoplasmático. [17 – 19] Calmodulina é uma proteína que funciona
83 como um sensor de Ca^{2+} , ligando-se a ele e ativando a fosfatase calcineurina. [20] A
84 calcineurina ativa o fator de transcrição Crz1, induzindo sua desfosforilação e translocação do
85 citoplasma para o núcleo, o que causa a expressão de diversos genes alvo como *PMC1*, *PMR1*
86 e *PMR2*, e reduz os níveis de cálcio intracelular. [21, 22] A caracterização de dois
87 transportadores vacuolares de cálcio, Pmc1 e Vcx1, de *C. neoformans* foi extensivamente
88 realizada por nosso grupo. O mutante nulo *vcx1* demonstrou ter virulência atenuada em modelo
89 de infecção intranasal em camundongos. Ademais, o mutante *vcx1* apresentou capacidade
90 reduzida de produzir GXM, o principal polissacarídeo capsular de *C. neoformans*, o que poderia
91 estar relacionado a sua reduzida taxa de fagocitose e sobrevivência após infecção em

macrófagos. [23] Mutantes nulos *pmc1* foram sensíveis a altas concentrações de cálcio, além de demonstrarem defeitos na formação da cápsula em meio DMEM e liberação de GXM. O transportador Pmc1 confirmou sua importância para a progressão pulmonar da doença e para a colonização do cérebro, visto que os mutantes nulos apresentaram carga fúngica pulmonar diminuída e impossibilidade de colonizar os tecidos cerebrais. [17]

Neste artigo, avaliamos o efeito de três fármacos bloqueadores de canais de cálcio em cinco linhagens de *C. neoformans*, determinando concentrações inibitórias mínimas (MICs) e sua interação com fluconazol, o principal fármaco para o tratamento da meningite criptocócica. Ademais, a expressão relativa de diversos genes da via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina foram analisadas na presença desses fármacos, bem como sua influência na expressão dos principais fatores de virulência deste patógeno.

Materiais e Métodos

Linhagens fúngicas e condições de cultivo

Foram utilizadas as linhagens de *C. neoformans* H99 (selvagem), o mutante *pmc1*, o mutante *vcx1*, o mutante duplo *pmc1vcx1* e a linhagem complementada *pmc1::PMC1*. As células foram cultivadas em ágar YPD (2% glicose, 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 1,5% ágar) e colônias isoladas subsequentemente inoculadas em YPD líquido ou meio mínimo e incubadas a 30°C por 18 horas a 200 rotações por minuto (rpm) para ensaios *in vitro*.

Seleção de fármacos

O *screening* de fármacos com mecanismo ação baseado no bloqueio de canais de cálcio foi realizado no banco de dados *Drug Bank* (<http://www.drugbank.ca/>). Todos os três fármacos foram dissolvidos em DMSO (Sigma) para a confecção dos estoques.

Teste de sensibilidade antifúngica e interação entre fármacos

115 A concentração inibitória mínima (MIC) dos fármacos contra as linhagens de *C.*
116 *neoformans* foi determinada pelo método de microdiluição, de acordo com o protocolo M27-
117 A3 preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). [24] Os testes foram
118 realizados em placas estéreis de 96 poços, utilizando a concentração de 5×10^2 células/mL em
119 meio RPMI 1640 e os fármacos diluídos em H₂O MilliQ. As placas foram incubadas a 37°C
120 por 48 horas e, posteriormente, a densidade ótica (OD) foi determinada em espectrofotômetro
121 (Spectramax, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) a 600 nm. As interações *in vitro* entre
122 fluconazol e os fármacos bloqueadores de canais de cálcio foram determinadas em placas
123 estéreis de 96 poços por meio de um método bidimensional denominado *checkerboard*, no qual
124 concentrações crescentes de fluconazol foram combinadas com concentrações crescentes do
125 fármaco bloqueador de canal de cálcio para verificação de efeito sinérgico de atuação entre elas.
126 [25] O MIC foi definido como a menor concentração a inibir 95% do crescimento ou mais,
127 comparado com o controle (MIC-0). A interação entre os fármacos foi definida pelo FIC index,
128 sendo ele definido como: (MIC da droga A em combinação) / (MIC da droga A sozinha) +
129 (MIC da droga B em combinação) / (MIC da droga B sozinha). A interação foi definida como
130 sinérgica se o FIC index for <1, aditiva se o FIC index for = 1 e antagônica se o FIC index for
131 >1. [26]

132 **Avaliação da expressão de genes relacionados a via de sinalização mediada por Ca²⁺-** 133 **calcineurina por RT-qPCR**

134 Para extração de RNA, as linhagens H99 e *pmc1* foram cultivadas por 20 horas a 30°C
135 e 200 rpm em meio YPD. Subsequentemente, 5×10^7 células/mL de cada linhagem foram
136 incubadas em 20 mL de meio YPD suplementado ou não com 6,81 µg/mL de amiodarona por
137 2 horas. Três amostras independentes de RNA foram preparadas utilizando TRIzol (Invitrogen),
138 de acordo com o protocolo do fabricante. Após tratamento com DNase, reações de transcriptase
139 reversa foram realizadas. Reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o sistema StepOne

Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *Platinum SYBR green qPCR Supermix* (Invitrogen) suplementado com 5pmol de cada primer e 1 µL de cDNA em um volume final de 20 µL foi utilizado como *mix* de reação. Cada amostra de cDNA foi analisada em triplicata com cada par de primer. Análise de *Melting Curve* foi realizada ao final da reação para confirmar a amplificação de um único produto de PCR. Os dados foram normalizados utilizando amplificação de actina a partir das amostras de cDNA. O método $2^{-\Delta C_t}$ foi utilizado para determinar a expressão relativa. [27] A lista de *primers* utilizados encontra-se nos materiais adicionais (Material adicional 3).

Ensaio de caracterização fenotípica

A formação de cápsula polissacarídica foi avaliada em 10^6 células/mL cultivadas em 1 mL de meio mínimo (2,7 g/L glicose, 2,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L glicina e 0,09 mg/L tiamina) por 72 horas a 37°C em 5% CO_2 com presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona. As células foram fixadas com paraformaldeído, coradas com *India ink* e observadas em um microscópio Axioskop 40 (Zeiss, Alemanha). Tamanho relativo de cápsula foi definido pela razão entre o tamanho total da célula com a cápsula e apenas do corpo celular. O software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) foi utilizado para determinar estas medidas de pelo menos 50 células em cada linhagem. A produção de melanina foi analisada em meio com asparagina e livre de glicose (1 g/L L-asparagina, 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L KH_2PO_4 , 1 mg/L tiamina e 1 mM L-DOPA) com a presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona. Foram utilizadas 5×10^6 células/mL e a OD lida a 400 nm em até 72 horas de incubação a 37°C. [28]

Determinação de cálcio intracelular

A concentração de cálcio livre intracelular foi determinada utilizando o marcador Fura-2-AM (Invitrogen). Células das linhagens H99 e *pmc1* foram cultivadas em meio YPD *overnight* a 30°C, por 200 rpm. Então, 10^7 células de cada linhagem foram incubadas por 2 horas em meio YPD suplementado ou não com 1,56 µg/mL de amiodarona e 100 mM de $CaCl_2$.

165 As células foram lavadas e incubadas com 10 μ M Fura-2-AM por 30 minutos a 37°C. Após
166 extensivas lavagens, a fluorescência foi avaliada ao alternar o comprimento de onda de
167 excitação entre 340 e 380 nm, com comprimento de onda de emissão fixado a 505 nm. A
168 concentração relativa de cálcio intracelular é expressa como a razão entre a fluorescência com
169 comprimento de onda de excitação a 340 e a 380 nm.

170 **Resultados**

171 **Fármacos bloqueadores de canais de cálcio**

172 Baseado no mecanismo de ação de bloqueio de canais de cálcio, foram selecionados três
173 fármacos para testes *in vitro* contra *C. neoformans*, amiodarona (Sigma), verapamil (Sigma) e
174 diltiazem (Sigma). A amiodarona pertence a classe III de antiarrítmicos, cujo principal
175 mecanismo é o bloqueio de canais de potássio. No entanto, a amiodarona apresenta
176 características de outras classes, como o bloqueio de canais de cálcio do tipo T. O verapamil e
177 diltiazem pertencem a classe IV, bloqueando canais de cálcio dependentes de voltagem, mais
178 especificamente os canais tipo L. Os dois pertencem a classe das não-diidropiridinas, no entanto
179 o verapamil é uma fenilalquilamina, enquanto o diltiazem é uma benzotiazepina. Por fim, todos
180 demonstram a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que evidencia a
181 possibilidade de atuarem contra a meningite criptocócica (Tabela 1).

182 **Amiodarona apresenta atividade antifúngica contra *C. neoformans***

183 A sensibilidade de *C. neoformans* a amiodarona foi testada na linhagem selvagem H99,
184 nas linhagens mutantes para canais de cálcio, *pmc1*, *vcx1*, *pmc1vcx1* e na linhagem
185 complementada *pmc1::PMC1*. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) para as respectivas
186 linhagens foram definidas considerando uma redução de pelo menos 95% de crescimento
187 comparado ao controle. Foi determinado um valor de MIC de 12,5 μ g/mL para as linhagens
188 H99 e *pmc1::PMC1*, e de 6,25 μ g/mL para as linhagens mutantes *pmc1*, *vcx1* e *pmc1vcx1* (Fig.
189 1), demonstrando que o nocaute de transportadores de cálcio está relacionada a uma maior

sensibilidade ao fármaco. Os fármacos verapamil e diltiazem foram testados contra a linhagem selvagem H99 de *C. neoformans* em concentrações de 25 µg/mL a 400 µg/mL. O fármaco verapamil demonstrou possuir um efeito antifúngico mediano, não sendo possível detectar uma inibição maior do que 50% de crescimento, mesmo em concentrações altas como 400 µg/mL. O diltiazem não apresentou efeito antifúngico, considerando que na maior concentração avaliada o efeito na inibição de crescimento não atingiu 20% em relação ao controle (Fig. 2).

Amiodarona e fluconazol possuem efeito sinérgico

A interação para avaliação de efeito sinérgico entre os fármacos amiodarona e fluconazol foi realizada pelo método *checkerboard* para as cinco linhagens de *C. neoformans*. Para obter o MIC de fluconazol para as respectivas linhagens, foram testadas concentrações de 0,125 a 64 µg/mL, como preconiza o protocolo M27-A3 do CLSI. [24] De acordo com os parâmetros definidos para espécies de *Candida* pelo CLSI, para uma linhagem ser suscetível ela deve apresentar um $MIC \leq 8$ µg/mL, para ser dose-dependente o MIC deve ser de 16 µg/mL a 32 µg/mL e se o MIC for ≥ 64 µg/mL a linhagem é resistente. Para todas as linhagens testadas, o MIC foi de 0,5 µg/mL, o que as classifica como suscetíveis a fluconazol. Ao combinar amiodarona e fluconazol, os MICs de ambos diminuíram, ficando entre 3,125 - 1,56 µg/mL e 0,25 - 0,125 µg/mL, respectivamente, como evidenciado na Tabela 2 (para os gráficos, ver Material Adicional 1). Para todas as linhagens, o *FIC index* calculado foi de 0,75, sendo os fármacos amiodarona e fluconazol interpretados como sinérgicos.

Os fármacos verapamil e diltiazem também foram testados em combinação com fluconazol para a linhagem selvagem H99. A interação entre os fármacos não demonstrou efeito sinérgico, não sendo possível perceber nenhum aumento da inibição de crescimento em comparação com o efeito dos fármacos sozinhos (ver Material Adicional 2).

Formação de cápsula polissacarídica e melanina não são afetadas por amiodarona

214 A formação da cápsula polissacarídica e a produção de melanina foram avaliadas na
 215 presença ou ausência de amiodarona por serem importantes fatores de virulência de *C.*
 216 *neoformans*. [3] Para avaliar a formação de cápsula polissacarídica, as células das linhagens
 217 H99, *pmc1*, *pmc1vcx1*, *vcx1* e *pmc1::PMC1* foram cultivadas em meio mínimo, uma clássica
 218 condição indutora de cápsula. Entre as linhagens houve um aumento da formação de cápsula
 219 polissacarídica no mutante *vcx1* e no complementado *pmc1::PMC1* (Fig. 3A). Com a exposição
 220 a 1,56 µg/mL de amiodarona, apenas a linhagem complementada demonstrou um aumento da
 221 produção de cápsula polissacarídica (Fig. 3A). A formação de melanina não sofreu alteração
 222 com a adição de amiodarona nas linhagens H99 e *pmc1*, tampouco houve diferença entre as
 223 linhagens em si (Fig. 3B), o que é condizente com estudos anteriores. [17]

224 **O fármaco amiodarona não influencia nos níveis relativos de cálcio intracelular**

225 A concentração relativa de cálcio intracelular nas linhagens H99 e *pmc1*, com a presença
 226 ou ausência de amiodarona e CaCl₂, foi determinada com o corante fluorescente sensível a
 227 cálcio, Fura-2-AM. Não houve diferença estatística entre as linhagens, com a adição ou não, de
 228 100 mM de CaCl₂ (Fig. 4). Tampouco houve diferença estatística nos níveis de cálcio com a
 229 adição de 1,56 µg/mL de amiodarona.

230 **Genes da via mediada por Ca²⁺-calcineurina tem sua expressão relativa alterada pela** 231 **exposição de células de *C. neoformans* a amiodarona**

232 Níveis de transcritos dos genes relacionados a via mediada por Ca²⁺- calcineurina foram
 233 avaliados em H99 e *pmc1*, na presença ou ausência de 6,81 µg/mL de amiodarona. Uma redução
 234 nos níveis de expressão do gene codificador do fator de transcrição Crz1 ocorreu na linhagem
 235 *pmc1* na presença de amiodarona. O mesmo foi observado para o gene *ECA1*, o qual codifica
 236 um transportador de cálcio do retículo endoplasmático. Para o gene *CCH1*, o qual codifica parte
 237 do canal de cálcio de alta afinidade na membrana da célula, houve um aumento de sua expressão
 238 na linhagem *pmc1* em comparação com o selvagem. Entretanto, para a o gene que codifica

calcineurina e para os genes que codificam os transportadores de cálcio vacuolares *Pmc1* e *Vcx1*, não houve diferença significativa entre as linhagens ou com a exposição a amiodarona (Fig. 5).

Discussão

O tratamento de doenças fúngicas ainda é um desafio, pois há um número menor de fármacos disponíveis para tratar essas doenças, em comparação com doenças bacterianas ou virais. Isso se deve ao fato de que a maquinaria celular dos fungos ser muito similar a dos humanos. O aumento de pacientes infectados pelo vírus HIV promoveu a disseminação da criptococose, transformando-a em uma comum causa de morte em pacientes imunocomprometidos. Apesar da eficácia no tratamento implicar na redução da mortalidade, em países onde o acesso a antifúngicos é limitado o número de mortes chega a 30%. [3] Portanto, o uso de novos antifúngicos, ou o reposicionamento de fármacos com efeito antifúngico, podem mostrar-se promissoras opções para o tratamento da criptococose. Courchesne (2002) identificou a atividade antifúngica de amiodarona contra diversas espécies de fungos, incluindo *C. neoformans*. [29] Sendo um bloqueador de canais de cálcio, a amiodarona possivelmente age em componentes da via mediada por Ca^{2+} -calcineurina, responsável por diversas funções no organismo do fungo, incluindo virulência, *mating*, crescimento a 37°C, frutificação monocariótica e resposta a estresse ambiental. [12 – 14] Portanto, neste estudo, objetivamos ampliar a caracterização do efeito antifúngico de amiodarona, além de avaliar outros fármacos com mecanismo semelhante que poderiam demonstrar potencial efeito antifúngico. Ademais, analisamos os efeitos desses fármacos em mutantes nulos para importantes transportadores da via mediada por Ca^{2+} -calcineurina.

A concentração inibitória mínima (MIC) de amiodarona foi determinada para as linhagens selvagem e mutantes nulos para transportadores de cálcio de *C. neoformans*. Esta análise evidenciou que os mutantes nulos para os transportadores de cálcio se mostraram mais

264 sensíveis ao fármaco. Estudos anteriores, realizados em *S. cerevisiae*, descreveram que a
265 amiodarona causa uma elevação bifásica dos níveis de cálcio intracelular. O primeiro pico
266 ocorre muito rapidamente, seguido de uma continuada elevação dos níveis intracelulares desse
267 íon. Na ausência dos transportadores de cálcio Pmc1 e Vcx1, o pico de cálcio intracelular foi
268 muito elevado, o que potencialmente explica a maior sensibilidade dos mutantes nulos para
269 esses transportadores à amiodarona, já que é bem conhecido o efeito tóxico que o excesso de
270 cálcio citoplasmático possui. [10] Esses fatores reforçam a importância desses transportadores,
271 responsáveis pelo direcionamento do cálcio intracelular para o vacúolo, na homeostase do
272 cálcio. A determinação de cálcio intracelular realizada neste estudo não demonstrou efeito da
273 amiodarona nos níveis de cálcio intracelular, inclusive com a adição de CaCl_2 ao meio. Uma
274 possibilidade pode ser o fato de o aumento nos níveis intracelulares deste íon seja dose-
275 dependente, já que o nível máximo observado em *S. cerevisiae* foi com concentrações de
276 amiodarona entre 10 μM e 20 μM [10], superiores a 1,56 $\mu\text{g/mL}$, a qual foi utilizada neste
277 estudo. Avaliações adicionais com concentrações maiores de amiodarona devem ser realizados
278 para confirmação desta hipótese. Além disso, a adição de CaCl_2 aos controles também não
279 demonstrou diferença, o que diverge de estudos anteriores, nos quais o mutante *pmc1*
280 apresentou aumento dos níveis de cálcio intracelular na presença de CaCl_2 [17], o que se mostra
281 coerente com a diminuição do transporte desse íon para o vacúolo.

282 O efeito sinérgico entre amiodarona e fluconazol foi demonstrado *in vitro* contra
283 linhagens de *C. neoformans*. Todas as linhagens avaliadas obtiveram o mesmo valor de *FIC*
284 *index*, apesar de alguns dos mutantes serem inibidos por uma concentração menor de
285 amiodarona do que a linhagem selvagem H99. Esses resultados mostram-se condizentes com
286 estudos que avaliaram o sinergismo destes fármacos em *C. albicans* e *S. cerevisiae*. [10, 11]
287 Gamarra, *et al* (2010) sugere que a amiodarona é responsável por uma hiperpolarização
288 passageira da membrana, seguido por uma despolarização, resultando em um influxo de cálcio

e consequente perda da viabilidade celular. O fluconazol é responsável pela depleção do ergosterol, o principal esterol componente da membrana celular fúngica, e uma alteração na via de biossíntese do ergosterol pode levar a efeitos na composição da membrana, resultando em uma fluidez alterada da membrana. [11] Zhang, *et al* (2010) também sugere que o ergosterol é um grande responsável pela manutenção da homeostase dos íons, como Ca^{2+} e H^+ . Portanto, a depleção de esterol pela exposição a fluconazol exacerbaria o desbalanceamento da homeostase de Ca^{2+} e H^+ causada pela amiodarona. [30]

C. neoformans tem fatores de virulência muito bem estabelecidos, entre eles a formação da cápsula polissacarídica e a produção de melanina. A expressão da cápsula está envolvida com a resistência a fagocitose e modulação do sistema imune. [3] A influência da amiodarona na formação da cápsula polissacarídica foi realizado em meio mínimo, amplamente caracterizado como indutor de cápsula. Não foi possível observar diferença no tamanho da cápsula polissacarídica após a adição de amiodarona ao meio, apenas um discreto aumento na linhagem complementada *pmc1::PMC1* que pode ser atribuído ao elevado número de células avaliadas. Entretanto, o meio mínimo induziu um aumento do tamanho da cápsula polissacarídica nas linhagens *vcx1* e *pmc1::PMC1*, em comparação a linhagem selvagem H99. Esse resultado difere do que foi obtido anteriormente em estudo do nosso grupo [17, 23], no qual o meio mínimo não induziu diferença no tamanho de cápsula das linhagens nesta condição. Esta variação pode ser atribuída a diferenças no tempo de exposição ao meio. A melanina é um pigmento responsável por proteger a célula da radiação ultravioleta, além de possuir propriedades antioxidantes. [3] O tratamento com amiodarona tampouco alterou a produção de melanina, não havendo nenhuma diferença significativa entre as linhagens na presença ou ausência do fármaco em questão.

Seis genes altamente relacionados a via de sinalização mediada por Ca^{2+} -calcineurina foram analisados na presença de amiodarona. Foram eles os genes que codificam a própria

314 calcineurina, o fator de transcrição Crz1, os transportadores vacuolares de cálcio Pmc1 e Vcx1,
315 o transportador de cálcio de retículo endoplasmático Eca1 e o componente do canal de cálcio
316 da membrana Cch1. Crz1 e Eca1 apresentaram uma diminuição de expressão relativa na
317 linhagem *pmc1* com a adição de amiodarona, no entanto esse efeito não foi observado para a
318 linhagem selvagem H99. Uma superexpressão do gene *CCH1* ocorreu também no mutante
319 *pmc1* em relação a linhagem selvagem, no entanto não houve nenhuma alteração com a adição
320 de amiodarona. Os demais genes analisados não demonstraram nenhuma diferença de
321 expressão entre as linhagens. Nos estudos anteriores com o mutante *pmc1* não foi possível
322 observar estas alterações, nem quando houve a adição de cálcio ao meio. [17] Em *C. albicans*,
323 genes da via mediada por Ca^{2+} -calcineurina, *CCH1*, *PMC1*, *MID1* e *CRZ1*, apresentaram
324 expressão aumentada na presença de amiodarona, ao contrário do que obtivemos neste estudo
325 para alguns destes genes no mutante nulo *pmc1*. [11] Apesar de divergentes, estes resultados
326 demonstram que a ação da amiodarona na célula fúngica altera fatores importantes da via
327 mediada por Ca^{2+} -calcineurina e que o transportador vacuolar de cálcio Pmc1 é de grande
328 importância para prevenir as alterações causadas por esse fármaco, visto que sua ausência
329 acarreta alterações não detectadas na linhagem selvagem. Além disto, esta divergência pode ser
330 atribuída ao meio de cultivo em que as células foram expostas ao fármaco. Neste estudo, foi
331 utilizado o meio YPD, classicamente utilizado como meio rico de cultivo para leveduras. Já no
332 estudo que caracteriza a expressão destes genes em *C. albicans*, foi utilizado o meio RPMI
333 1640.

334 Os demais fármacos bloqueadores de canais de cálcio testados, verapamil e diltiazem,
335 demonstraram efeitos antifúngicos pouco promissores, com um máximo de 50% e 20% de
336 inibição de crescimento, respectivamente. Ademais, ao combiná-los com fluconazol, não foi
337 possível verificar atividade sinérgica. A diferença de efeitos pode ser devido aos fármacos
338 pertencerem a classes diferentes e atuarem em canais distintos aos observados para amiodarona.

Conclusão

Em suma, neste estudo foi demonstrada a eficácia do fármaco amiodarona contra linhagens de *C. neoformans* e seu efeito sinérgico com fluconazol, *in vitro*. Mais estudos serão realizados para avaliar o efeito dessa combinação em modelos de infecção *in vivo*. Esses dados reforçam a possibilidade deste fármaco ser utilizado na clínica combinado com fluconazol, abrindo novas possibilidades de tratamento para a meningite criptocócica.

Aprovação ética e consentimento para participar

Não aplicável

Consentimento para publicação

Não aplicável

Disponibilidade de dados e materiais

Não aplicável

Interesses competitivos

A autora declara que não há nenhum interesse competitivo.

Financiamento

CAPES e CNPq.

Contribuições dos autores

NKO e ES realizaram e analisaram todos os dados experimentais. LK projetou o estudo, analisou os dados, coordenou o estudo e revisou o manuscrito. NKO escreveu o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

As agências de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Informações dos autores

Natália Kronbauer de Oliveira é aluna de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Eamim Squizani é aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em

364 Biologia Molecular e Celular, Cbiot, UFRGS. Livia Kmetzsch é professora do Departamento
365 de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS.

366 **Material adicional**

367 **Material adicional 1**

368 Amiodarona apresenta sinergismo quando combinada com fluconazol em linhagens de *C.*
369 *neoformans*. As interações *in vitro* foram determinadas por meio de um método bidimensional
370 denominado *checkerboard*, no qual concentrações crescentes de fluconazol foram combinadas
371 com concentrações crescentes de amiodarona para verificação de efeito sinérgico de atuação
372 entre elas. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C, por 48 horas, com
373 subsequente leitura de OD a 600nm para avaliar crescimento celular. (A) Linhagem selvagem
374 H99. (B) Linhagem mutante *pmc1*. (C) Linhagem mutante *vcx1*. (D) Linhagem mutante
375 *pmc1vcx1*. (E) Linhagem complementada *pmc1::PMC1*.

376 **Material adicional 2**

377 Verapamil e diltiazem não apresentam sinergismo quando combinados com fluconazol em
378 linhagens de *C. neoformans*. As interações *in vitro* foram determinadas por meio de um método
379 bidimensional denominado *checkerboard*, no qual concentrações crescentes de fluconazol
380 foram combinadas com concentrações crescentes de amiodarona para verificação de efeito
381 sinérgico de atuação entre elas. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C, por
382 48 horas, com subsequente leitura de OD a 600nm para avaliar crescimento celular. (A)
383 Linhagem selvagem H99 com fármaco verapamil. (B) Linhagem selvagem H99 com fármaco
384 diltiazem.

385 **Material adicional 3**

386 Lista de *primers* utilizados neste estudo.

387 **Referências**

- 388
- 389 1. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and
390 *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. Scientifica (Cairo).

2013;2013:675213.

2. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009;23(4):525-30.
3. Idnurm A, Bahn YS, Nielsen K, Lin X, Fraser JA, Heitman J. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):753-64.
4. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):291-322.
5. Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol*. 2009;26(4):223-7.
6. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003;11(6):272-9.
7. Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, McDonald TR, Okagaki LH, Alhadab AA, et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7197-204.
8. Bratton EW, El Hussein N, Chastain CA, Lee MS, Poole C, Stürmer T, et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2485-95.
9. Zhai B, Wu C, Wang L, Sachs MS, Lin X. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3758-66.
10. Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28831-9.
11. Gamarra S, Rocha EM, Zhang YQ, Park S, Rao R, Perlin DS. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):1753-61.
12. Cruz MC, Fox DS, Heitman J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*. 2001;20(5):1020-32.

13. Fox DS, Cruz MC, Sia RA, Ke H, Cox GM, Cardenas ME, et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. 2001;39(4):835-49.
14. Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J*. 1997;16(10):2576-89.
15. Liu M, Du P, Heinrich G, Cox GM, Gelli A. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1788-96.
16. Yu Q, Wang F, Zhao Q, Chen J, Zhang B, Ding X, et al. A novel role of the vacuolar calcium channel Yvc1 in stress response, morphogenesis and pathogenicity of *Candida albicans*. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(3-4):339-50.
17. Kmetzsch L, Staats CC, Cupertino JB, Fonseca FL, Rodrigues ML, Schrank A, et al. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. *FEBS J*. 2013;280(19):4853-64.
18. Aiello DP, Fu L, Miseta A, Sipos K, Bedwell DM. The Ca²⁺ homeostasis defects in a *pgm2Delta* strain of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca²⁺ uptake mediated by the Ca²⁺-ATPase Pmc1p. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38495-502.
19. Fan W, Idnurm A, Breger J, Mylonakis E, Heitman J. Eca1, a sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2007;75(7):3394-405.
20. Kraus PR, Nichols CB, Heitman J. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryot Cell*. 2005;4(6):1079-87.
21. Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, et al. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2002;277(34):31079-88.
22. Bodvard K, Jörhov A, Blomberg A, Molin M, Käll M. The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca²⁺/calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS One*. 2013;8(1):e53404.
23. Kmetzsch L, Staats CC, Simon E, Fonseca FL, de Oliveira DL, Sobrino L, et al. The vacuolar Ca²⁺(+) exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺(+) tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2010;9(11):1798-805.
24. Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Document M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), Wayne, Pa, USA, 2nd edition, 2002.
25. Afeltra J, Vitale RG, Mouton JW, Verweij PE. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against

clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1335-43.

26. Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):702-7.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
28. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(5):855-67.
29. Courchesne WE. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(1):195-9.
30. Zhang YQ, Gamarra S, Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS, Rao R. Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathog.* 2010;6(6):e1000939.

508 Tabela 1: Fármacos bloqueadores de canais de cálcio selecionados para avaliação de potencial atividade
509 antifúngica

Fármaco	Tratamento	Mecanismo de ação	Barreira hematoencefálica
Amiodarona	Arritmias	Bloqueador de canais de cálcio tipo T	+
Verapamil	Hipertensão e angina	Bloqueador de canais de cálcio tipo L	+
Diltiazem	Hipertensão e angina	Bloqueador de canais de cálcio tipo L	+

510

511 Tabela 2. Avaliação da suscetibilidade e interação entre fármacos para linhagens de *C. neoformans*

Linhagem	MIC ^a		MIC ^a combinação		FIC index	Interpretação ^b
	AMD	FLC	AMD	FLC		
H99	12.5	0.5	3.125	0.25	0.75	Sinérgico
<i>pmc1</i>	6.25	0.5	1.56	0.25	0.75	Sinérgico
<i>vcx1</i>	6.25	0.5	3.125	0.125	0.75	Sinérgico
<i>pmc1vcx1</i>	6.25	0.5	1.56	0.25	0.75	Sinérgico
<i>pmc1::PMC1</i>	12.5	0.5	3.125	0.25	0.75	Sinérgico

512 ^a Valores em µg/mL

513 ^b (Te Dorsthorst *et al.*, 2002)

514 Abreviações: AMD – amiodarona; FLC – fluconazol

515

516 Legenda das figuras

517 Fig. 1: Determinação de concentração inibitória mínima (MIC) de amiodarona para linhagens
518 de *C. neoformans*. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C, por 48 horas,
519 na ausência ou presença de amiodarona (0,78 a 12,5 µg/mL) com subsequente leitura de OD a
520 600nm para avaliar crescimento celular. (A) Linhagem selvagem H99. (B) Linhagem mutante
521 *pmc1*. (C) Linhagem mutante *vcx1*. (D) Linhagem mutante *pmc1vcx1*. (E) Linhagem
522 complementada *pmc1::PMC1*.

523

524 Fig. 2: Sensibilidade de linhagens de *C. neoformans* a fármacos bloqueadores de canais de
525 cálcio. Os cultivos foram realizados em meio RPMI-1640, a 37 °C por 48 horas, na ausência
526 ou presença de fármaco (25 µg/mL a 400 µg/mL) com subsequente leitura de OD a 600nm para

avaliar crescimento celular. (A) Sensibilidade da linhagem selvagem H99 ao fármaco verapamil. (B) Sensibilidade da linhagem selvagem H99 ao fármaco diltiazem.

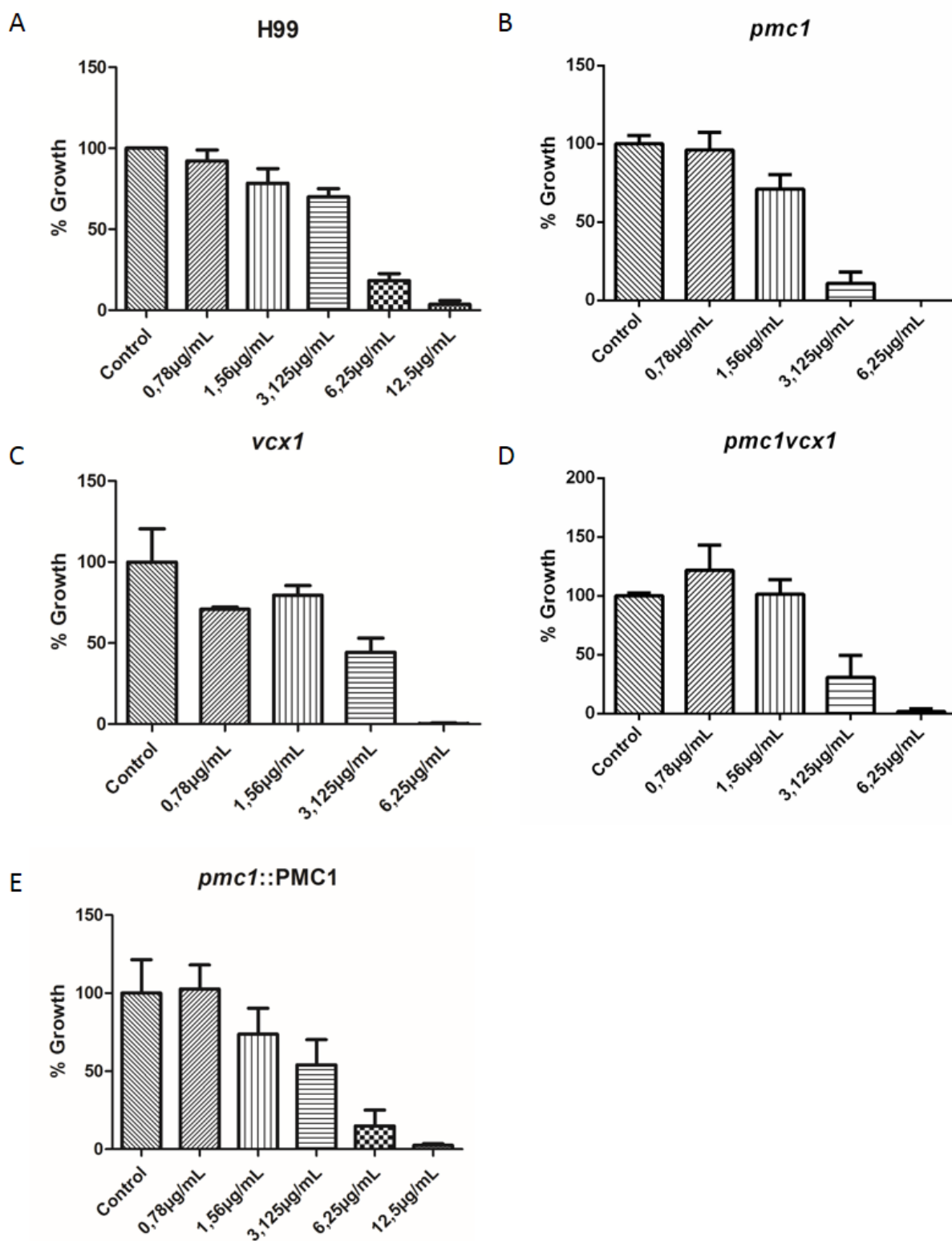
Fig. 3: Amiodarona não afeta características fenotípicas de *C. neoformans*. (A) Determinação da medida da cápsula polissacarídica em condições indutoras de cápsula (meio mínimo, 37 °C, 5% CO₂), na presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona e subsequente contracoloração com *India Ink*: ** P < 0.01. (B) Produção de melanina em meio asparagina livre de glicose, suplementado com L-DOPA, na presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona. Incubação à 37 °C, 200 rpm por até 72 horas e subsequente leitura de OD a 400 nm.

Fig. 4: Amiodarona não altera os níveis de cálcio intracelulares em *C. neoformans*. O nível relativo de cálcio intracelular em H99 e *pmc1* foram determinados usando Fura-2 AM, na presença ou ausência de 1,56 µg/mL de amiodarona. A concentração relativa de cálcio intracelular é expressa como a razão entre a fluorescência emitida a 505 nm com excitação de 340 ou de 380 nm.

Fig. 5: A expressão relativa de genes envolvidos na via mediada por Ca²⁺-calcineurina são afetados pela amiodarona. Os níveis de transcritos relativos referentes a transportadores de cálcio (*ECA1*, *PMCI*, *VCX1* e *CCH1*), calcineurina e o fator de transcrição *CRZ1* foram quantificados por RT-qPCR nas linhagens H99 e *pmc1*, na presença ou ausência de 6,81 µg/mL de amiodarona. Os dados foram normalizados utilizando amplificação de actina a partir das amostras de cDNA. *P < 0.05; **P < 0.01.

553

Fig. 1



554

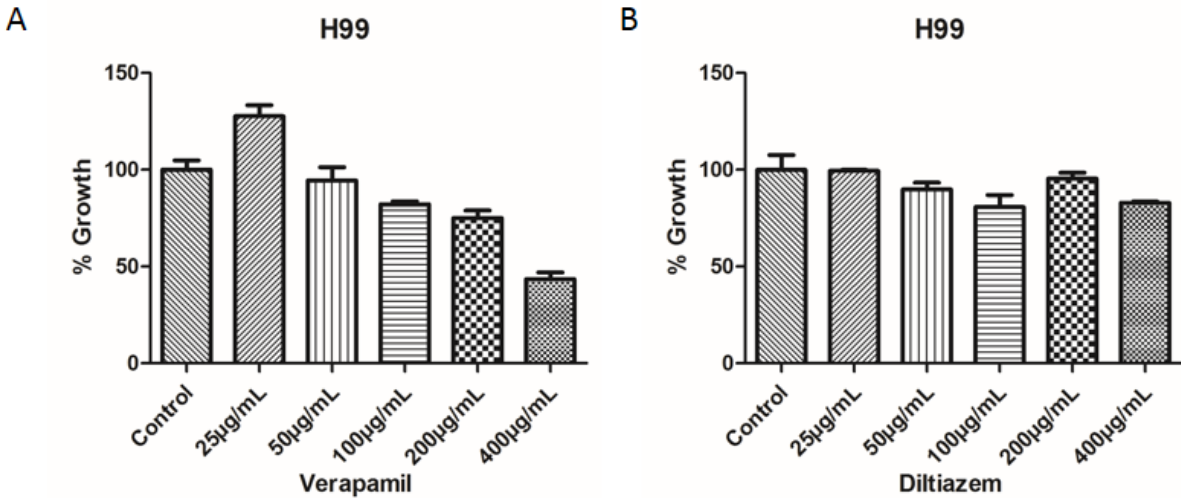
555

556

557

558

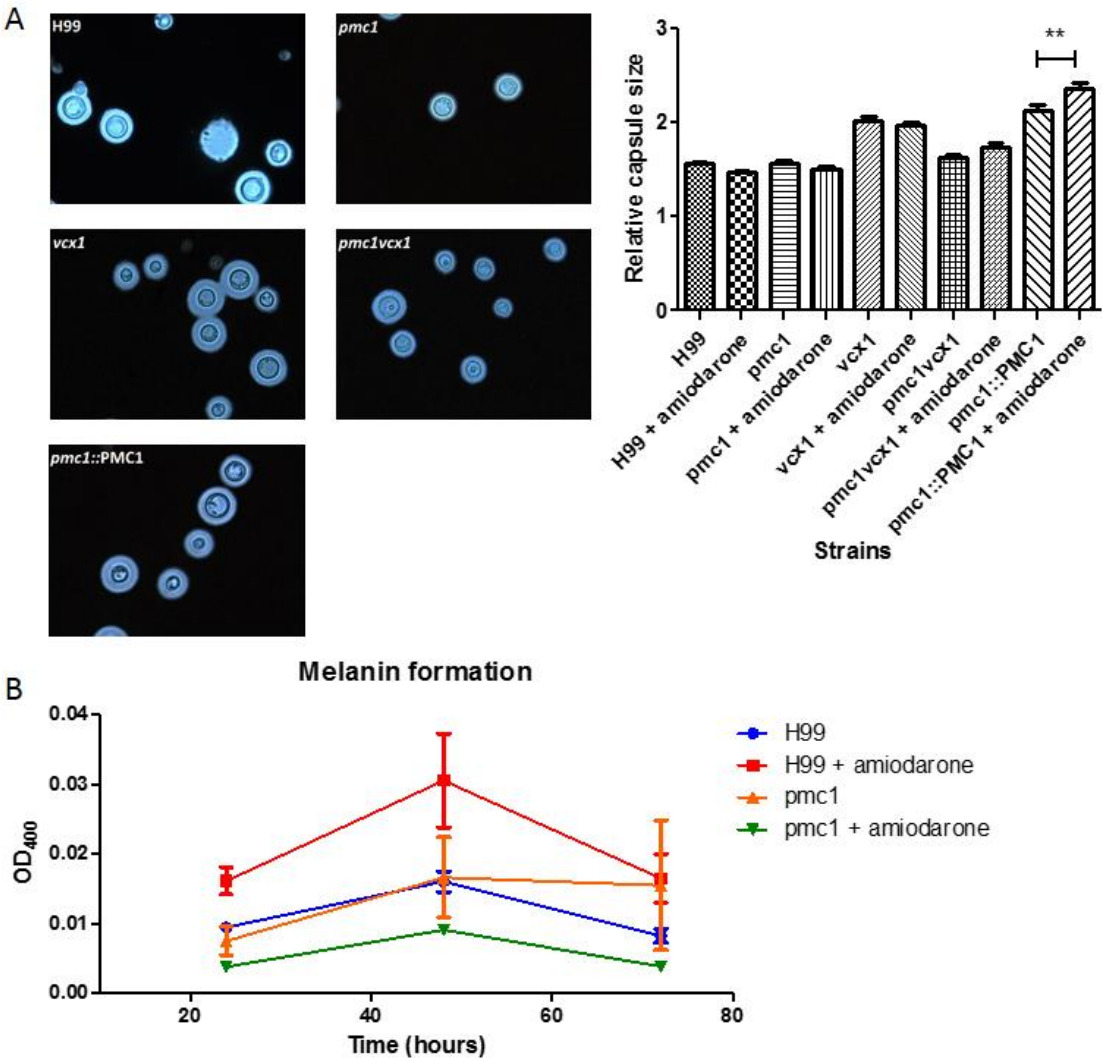
Fig. 2



559

560

Fig. 3

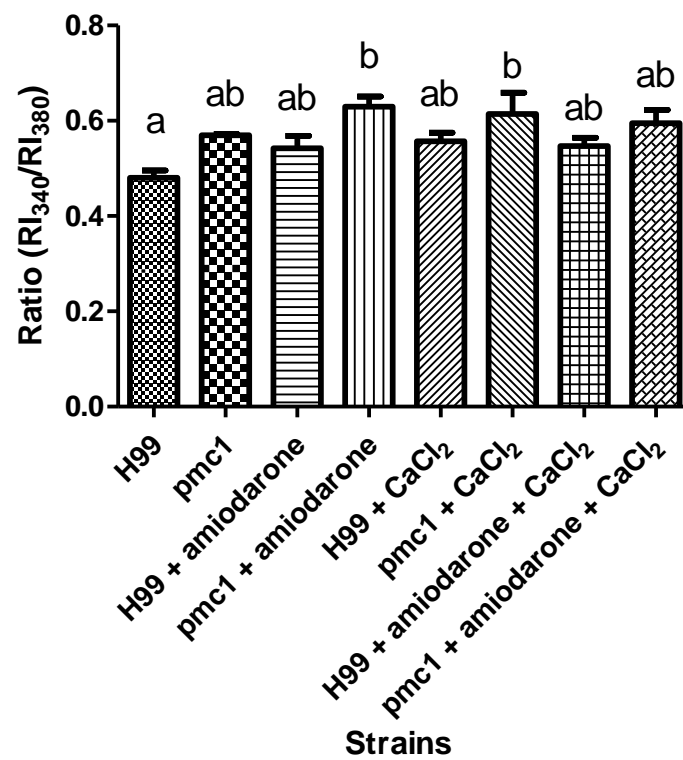


561

562

563

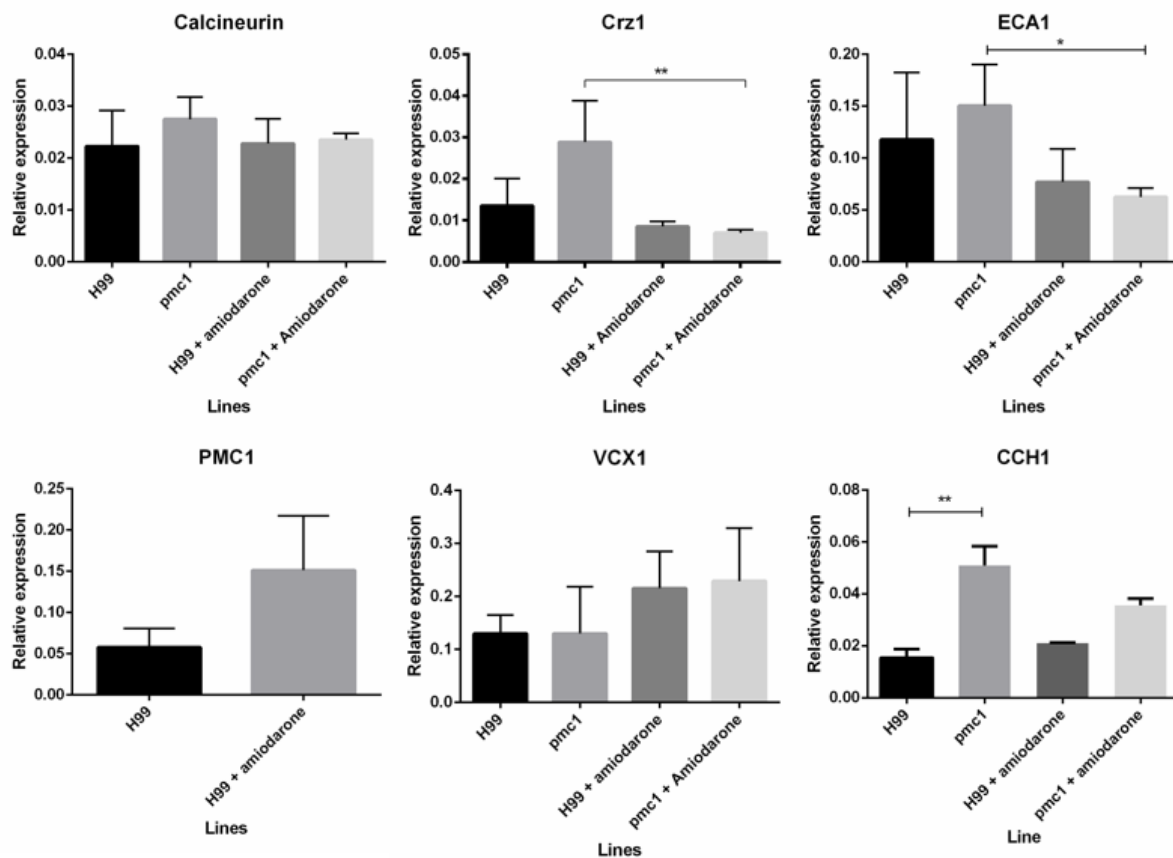
Fig. 4



564

565

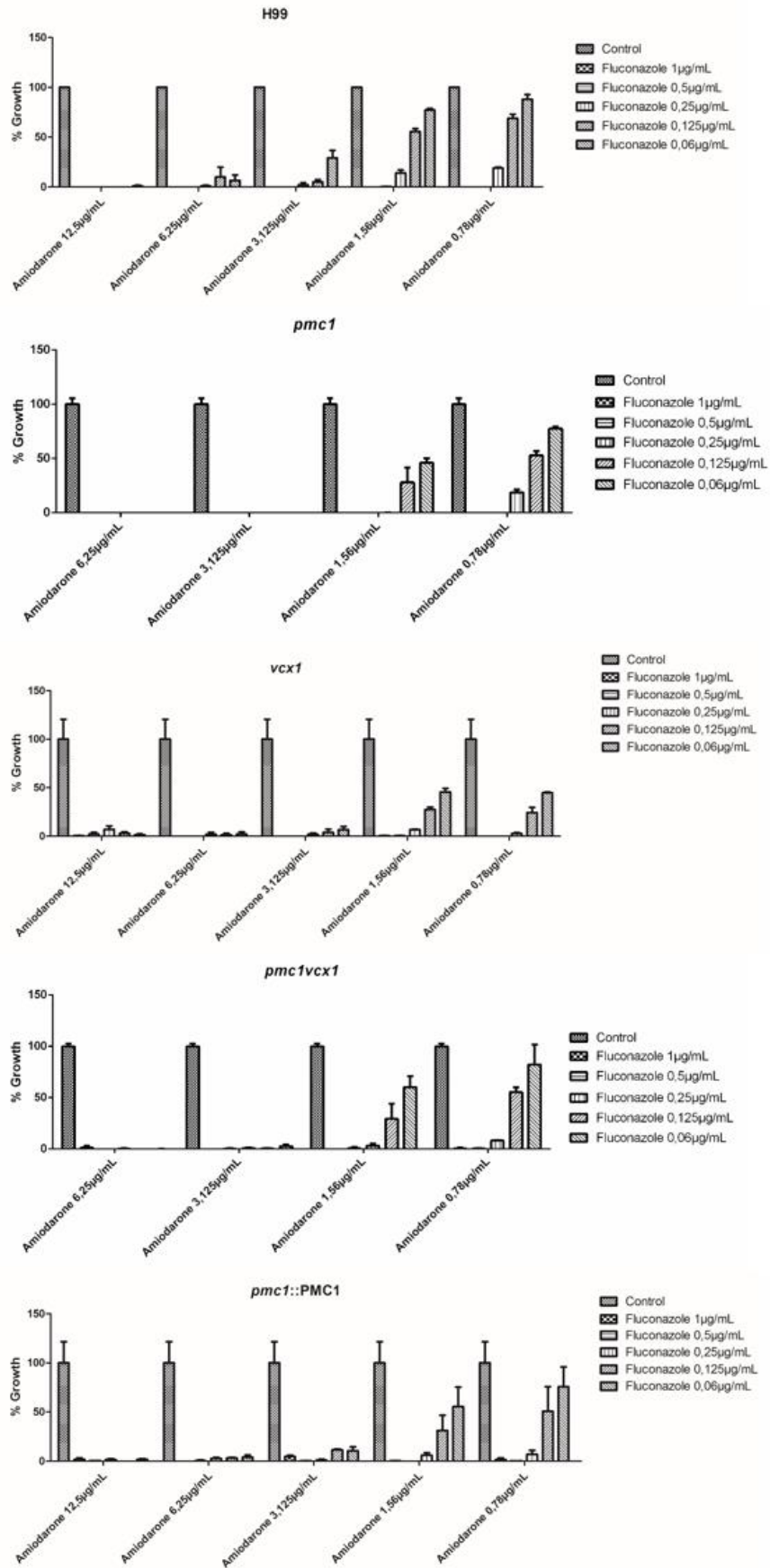
Fig. 5



566

567

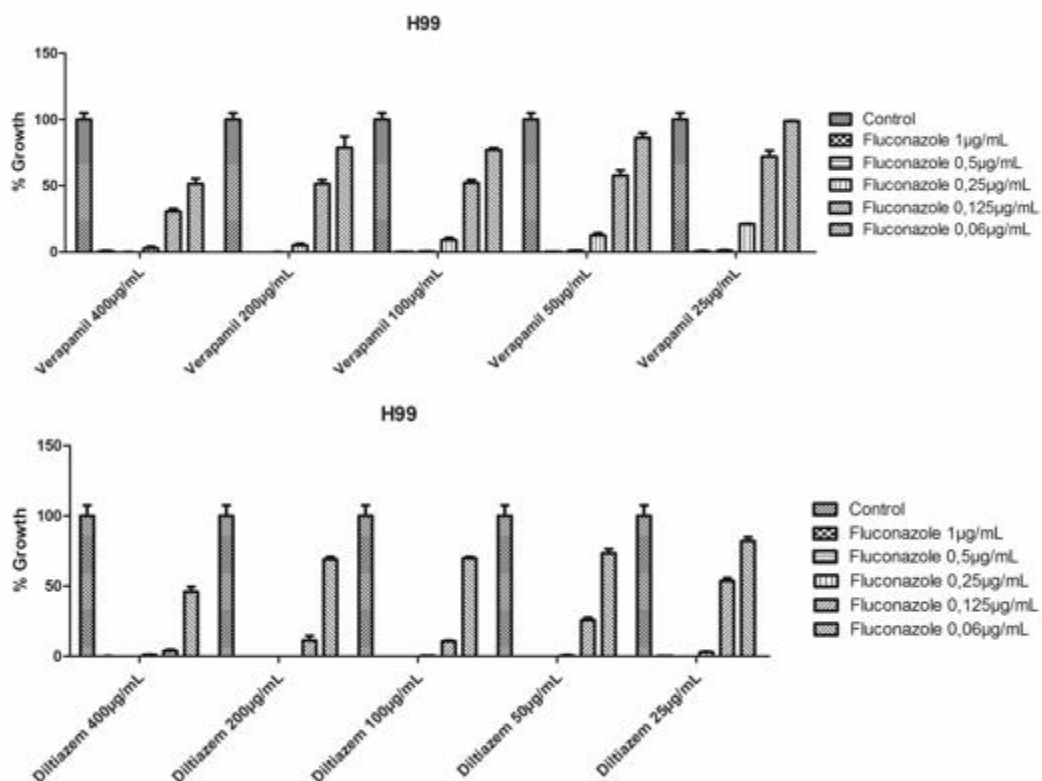
Material adicional 1



568

569

Material adicional 2



570

571

Material adicional 3

572

Lista de *primers* utilizados neste estudo

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')
RTVcxF	ATCGCCTTGTTCATTCCC
RTVcxR	TCATCAGGACCATACCTTCCA
RTACTF	CCTTCTACGTCTCTATCCAG
RTACTR	TTTCAAGCTGAGAAGACTGG
Cch1RTF	GCAAACCTCCGTCCCAACTAC
Cch1RTR	GCACCTCGTTCAGCAGATTTC
Eca1RTF	GAGAGGCTTATGGCGAAAAC
Eca1RTR	ATGGCGAGGATGAATGAGAC
Pmc1RTF	GCCAACCAATCTCTTCGTAC
Pmc1RTR	TCTACCGCCTCTCTTACACC
CNAG04796F (Calcineurina)	TGGCTCAGAAAAGACAAACGAG
CNAG04796R (Calcineurina)	TTCCGATACATCCGATAACCG
CNAG00156F (Crz1)	CCGATAAGTGGATTGAAGGAAG
CNAG00156R (Crz1)	ATGGGATTGTGGAGAAGGAAC

573

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- *C. neoformans* apresenta sensibilidade a amiodarona, com os mutantes nulos para transportadores de cálcio obtendo valores de concentração inibitória mínima (MIC) mais baixos que as linhagens selvagem e complementada.
- Amiodarona demonstrou interagir com fluconazol contra células de *C. neoformans in vitro*. O FIC index calculado a partir dos MICs dos fármacos indicou sinergismo entre eles.
- Diltiazem e verapamil não apresentaram efeito antifúngico e tampouco demonstraram interagir sinergicamente com fluconazol.
- Os fatores de virulência de *C. neoformans*, formação de cápsula polissacarídica e produção de melanina, não apresentaram diferença pela adição de amiodarona, apenas um leve aumento da formação de cápsula polissacarídica na linhagem complementada *pmc1::PMC1*.
- Não foi possível observar diferença entre as linhagens de *C. neoformans* quanto a determinação de cálcio intracelular após incubação com amiodarona. Isso pode ser devido a concentração de amiodarona utilizada.
- Uma redução no nível de expressão do fator de transcrição Crz1 ocorreu na linhagem *pmc1* ao adicionar amiodarona, bem como no transportador de cálcio do retículo endoplasmático Eca1. Para Cch1, parte do canal de cálcio de alta afinidade na membrana da célula, houve um aumento na expressão na linhagem *pmc1* em comparação com o selvagem.
- Esses dados reforçam a possibilidade deste fármaco ser utilizado na clínica combinado com fluconazol, abrindo novas possibilidades de tratamento para a meningite criptocócica.
- As perspectivas são avaliar o efeito sinérgico entre amiodarona e fluconazol obtido *in vitro* em modelo animal e selecionar mais fármacos bloqueadores de canais de cálcio, avaliando sua eficácia contra *C. neoformans* e seu sinergismo com fluconazol.

REFERÊNCIAS

- BRATTON, E. W. et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2485-95, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478968> >.
- BRATTON, E. W. et al. Approaches to antifungal therapies and their effectiveness among patients with cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 6, p. 2485-95, Jun 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478968> >.
- BUTTS, A. et al. A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. **Eukaryot Cell**, v. 12, n. 2, p. 278-87, Feb 2013. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243064> >.
- CASADEVALL, A.; ROSAS, A. L.; NOSANCHUK, J. D. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 3, n. 4, p. 354-8, Aug 2000. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972493> >.
- COELHO, C.; CASADEVALL, A. Cryptococcal therapies and drug targets: the old, the new and the promising. **Cell Microbiol**, Mar 2016. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26990050> >.
- COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica (Cairo)**, v. 2013, p. 675213, 2013. ISSN 2090-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278784> >.
- COURCHESNE, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 1, p. 195-9, Jan 2002. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752116> >.
- COWEN, L. E. et al. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 8, p. 2818-23, Feb 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196973> >.
- DA SILVA, C. R. et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 4, p. 1691-700, Apr 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357774> >.
- GAMARRA, S. et al. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 5, p. 1753-61, May 2010. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194694> >.
- GUPTA, S. S. et al. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 31, p. 28831-9, Aug 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754197> >.
- IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 753-64, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16132036> >.

KLEPSE, M. E.; WOLFE, E. J.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 41, n. 3, p. 397-401, Mar 1998. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9578168> >.

KMETZSCH, L. et al. The calcium transporter Pmc1 provides Ca²⁺ tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS J**, v. 280, n. 19, p. 4853-64, Oct 2013. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895559> >.

_____. The vacuolar Ca²⁺ exchanger Vcx1 is involved in calcineurin-dependent Ca²⁺ tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell**, v. 9, n. 11, p. 1798-805, Nov 2010. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20889719> >.

KOZUBOWSKI, L.; LEE, S. C.; HEITMAN, J. Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. **Cell Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 370-80, Mar 2009. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19170685> >.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 2009. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836985> >.

LIU, S. et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryot Cell**, v. 14, n. 4, p. 324-34, Apr 2015. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636321> >.

MIRZA, S. A. et al. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 6, p. 789-94, Mar 2003. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12627365> >.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J.; GOW, N. A. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 272-9, Jun 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823944> >.

PARK, B. J. et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-30, Feb 2009. ISSN 1473-5571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676> >.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 3, p. 291-322, Feb 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047480> >.

PRADO, M. et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-21, May 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547881> >.

REOLON, A.; PEREZ, L. R. R.; MEZZARI, A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 293-298, 2004. ISSN 1676-2444. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442004000500003&nrm=iso >.

RHEIN, J. et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study. **Lancet Infect Dis**, Mar 2016. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971081> >.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 1297-313, Nov 2012. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448> >.

SMITH, K. D. et al. Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7197-204, Dec 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324276> >.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H.; DOERING, T. L. *Cryptococcus neoformans*: historical curiosity to modern pathogen. **Yeast**, v. 31, n. 2, p. 47-60, Feb 2014. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375706> >.

TSENG, H. K. et al. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiol**, v. 10, n. 10, p. 1669-82, 2015. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437710> >.

VECCHIARELLI, A. et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Future Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 1107-16, Sep 2013. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020739> >.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 2, p. 171-9, Aug 2000. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933638> >.

ZHAI, B. et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3758-66, Jul 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508310> >.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BMC MICROBIOLOGY

PREPARING YOUR MANUSCRIPT

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

Methods (can also be placed after Background)

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Declarations

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, this section is not applicable to your submission. Please state “Not applicable” in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent to publish must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent to publish. You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain any individual persons data, please state “Not applicable” in this section.

Availability of data and material

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spreadsheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the [list of recommended repositories](#) in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Criteria section for this article type (located at the top of this page) for journal specific policies.

For all journals, authors must include an “Availability of data and materials” section in their article detailing where the data supporting their findings can be found. If you do not wish to share your data, please state that data will not be shared, and state the reason.

For information on how to cite your data and format this section see [preparing your manuscript](#).

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section. See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

For group authorship: if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the “Acknowledgements” section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can

add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

GENERAL FORMATTING INFORMATION

Manuscripts must be written in concise English. For help on scientific writing, or preparing your manuscript in English, please see Springer's [Author Academy](#).

Quick points:

- Use double line spacing
- Include line and page numbering
- Use SI units: Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF
- Do not use page breaks in your manuscript

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)

Please note: editable files are required for processing in production. If your manuscript contains any non-editable files (such as PDFs) you will be required to re-submit an editable file if your manuscript is accepted.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Style and language

Manuscripts submitted to most journals do not undergo copyediting for style and language. Please check individual journal 'About' pages to confirm whether accepted manuscripts will undergo copyediting for style and language.

You can use a professional language editing service of your choice if you want to. Such services include:

- Edanz Language Editing. BioMed Central authors can obtain a 10% discount to the fee charged by Edanz if they choose to use this service.
- Nature Publishing Group Language Editing. Authors can use this coupon code to claim a 10% discount: LE_BM15

Contact the service providers directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Data and materials

For all journals, BioMed Central strongly encourages all datasets on which the conclusions of the manuscript rely to be either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main paper or additional supporting files, in machine-readable format (such as spread sheets rather than PDFs) whenever possible. Please see the list of recommended repositories in our editorial policies.

For some journals, deposition of the data on which the conclusions of the manuscript rely is an absolute requirement. Please check the Instructions for Authors for the relevant journal and article type for journal specific policies.

For all manuscripts, information about data availability should be detailed in an 'Availability of data and materials' section. For more information on the content of this section, please see the Declarations section of the relevant journal's Instruction for Authors. For more information on BioMed Central's policies on data availability, please see our [editorial policies](#).

Formatting the 'Availability of data and materials' section of your manuscript

The following format for the 'Availability of data and materials' section of your manuscript should be used:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

The following format is required when data are included as additional files:

"The dataset(s) supporting the conclusions of this article is(are) included within the article (and its additional file(s))."

For databases, this section should state the web/ftp address at which the database is available and any restrictions to its use by non-academics.

For software, this section should include:

- Project name: e.g. My bioinformatics project
- Project home page: e.g. <http://sourceforge.net/projects/mged>
- Archived version: DOI or unique identifier of archived software or code in repository (e.g. enodo)
- Operating system(s): e.g. Platform independent
- Programming language: e.g. Java
- Other requirements: e.g. Java 1.3.1 or higher, Tomcat 4.0 or higher
- License: e.g. GNU GPL, FreeBSD etc.
- Any restrictions to use by non-academics: e.g. licence needed

Information on available repositories for other types of scientific data, including clinical data, can be found in our [editorial policies](#).

References

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice.

What should be cited?

Only articles, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited.

Unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE.

Any in press articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Authors may wish to make use of reference management software to ensure that reference lists are correctly formatted. An example of such software is Papers, which is part of Springer Science+Business Media.

PREPARING FIGURES

When preparing figures, please follow the formatting instructions below.

- Figures should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.
- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file that fits on a single page in portrait format.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.
- Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figures should be uploaded in the correct orientation.
- Figure titles (max 15 words) and legends (max 300 words) should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- Figure keys should be incorporated into the graphic, not into the legend of the figure.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see our detailed instructions.
- Individual figure files should not exceed 10 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- **Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere.** In order for all figures to be open access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non open access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

Figure file types

We accept the following file formats for figures:

- EPS (suitable for diagrams and/or images)
- PDF (suitable for diagrams and/or images)

- Microsoft Word (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- PowerPoint (suitable for diagrams and/or images, figures must be a single page)
- TIFF (suitable for images)
- JPEG (suitable for photographic images, less suitable for graphical images)
- PNG (suitable for images)
- BMP (suitable for images)
- CDX (ChemDraw - suitable for molecular structures)

Figure size and resolution

Figures are resized during publication of the final full text and PDF versions to conform to the BioMed Central standard dimensions, which are detailed below.

Figures on the web:

- width of 600 pixels (standard), 1200 pixels (high resolution).

Figures in the final PDF version:

- width of 85 mm for half page width figure
- width of 170 mm for full page width figure
- maximum height of 225 mm for figure and legend
- image resolution of approximately 300 dpi (dots per inch) at the final size

Figures should be designed such that all information, including text, is legible at these dimensions. All lines should be wider than 0.25 pt when constrained to standard figure widths. All fonts must be embedded.

Figure file compression

Vector figures should if possible be submitted as PDF files, which are usually more compact than EPS files.

- TIFF files should be saved with LZW compression, which is lossless (decreases file size without decreasing quality) in order to minimize upload time.

- JPEG files should be saved at maximum quality.
- Conversion of images between file types (especially lossy formats such as JPEG) should be kept to a minimum to avoid degradation of quality.

If you have any questions or are experiencing a problem with figures, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

PREPARING TABLES

When preparing tables, please follow the formatting instructions below.

- Tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.).
- Tables less than one A4 or Letter page in length can be placed in the appropriate location within the manuscript.
- Tables larger than one A4 or Letter page in length can be placed at the end of the document text file. Please cite and indicate where the table should appear at the relevant location in the text file so that the table can be added in the correct place during production.
- Larger datasets, or tables too wide for A4 or Letter landscape page can be uploaded as additional files. Please see [below] for more information.
- Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). Please use the standard file extensions.
- Table titles (max 15 words) should be included above the table, and legends (max 300 words) should be included underneath the table.
- Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.
- Color and shading may not be used. Parts of the table can be highlighted using superscript, numbering, lettering, symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend.
- Commas should not be used to indicate numerical values.

If you have any questions or are experiencing a problem with tables, please contact the customer service team at info@biomedcentral.com.

PREPARING ADDITIONAL FILES

As the length and quantity of data is not restricted for many article types, authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

All Additional files will be published along with the accepted article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files, if requested, should be sent by email to the journal's editorial email address, quoting the manuscript reference number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" should be included as additional files. Since many web links and URLs rapidly become broken, BioMed Central requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. Do not include any individual participant details. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.